

**Clonage et vecteur de clonage  
ou  
Technologie de l'ADN  
recombinant**

# Principes

## ORGANISME DONNEUR

Extraction et coupure de l'ADN en fragment contenant de un à plusieurs fragments d'intérêt.

## VECTEUR

Ou transporteur d'ADN.  
C'est un fragment d'ADN capable de répllication autonome.

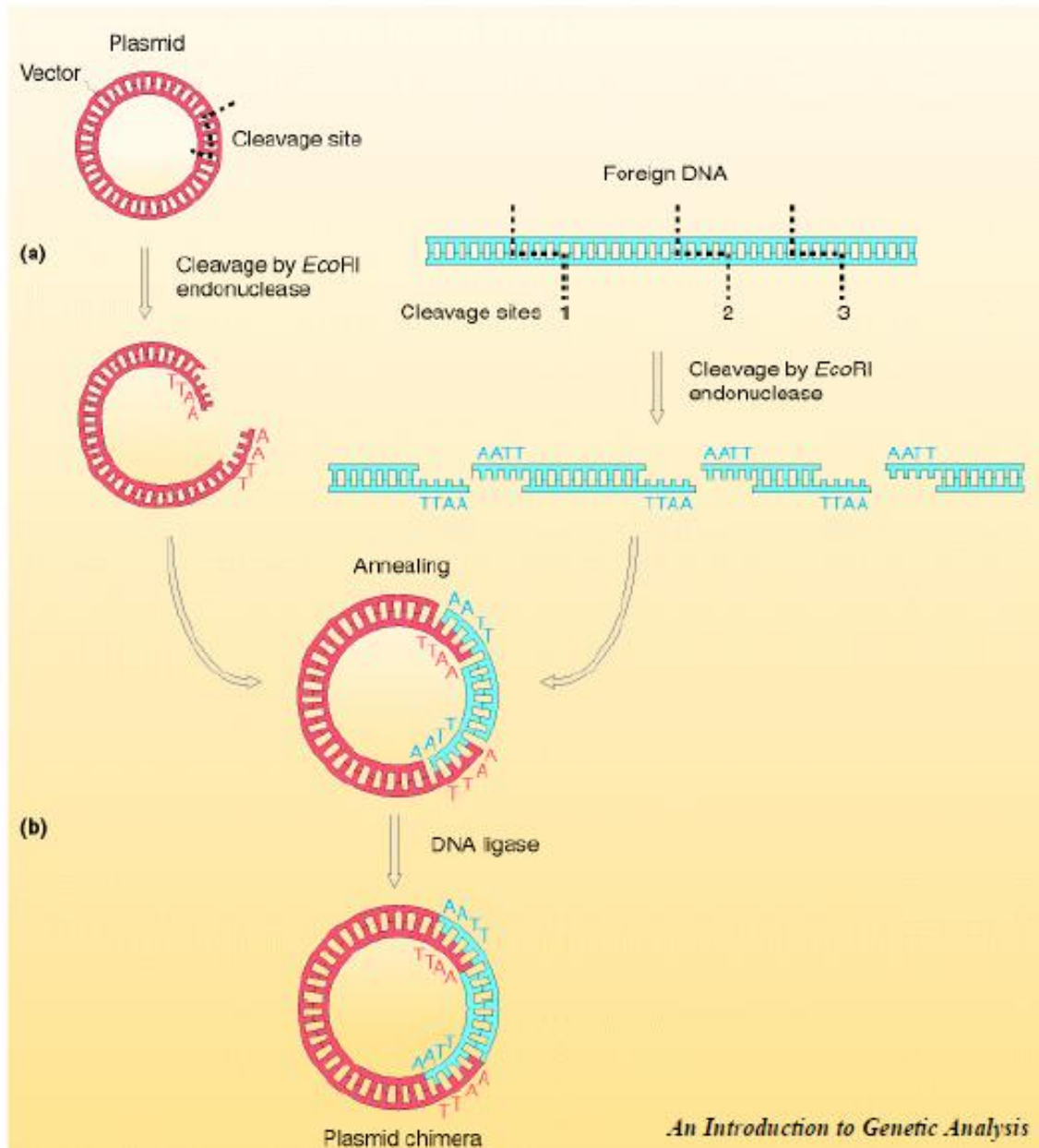
insertion individuelle de chaque fragment d'ADN dans une molécule de vecteur.

Obtention de l'ADN recombinant

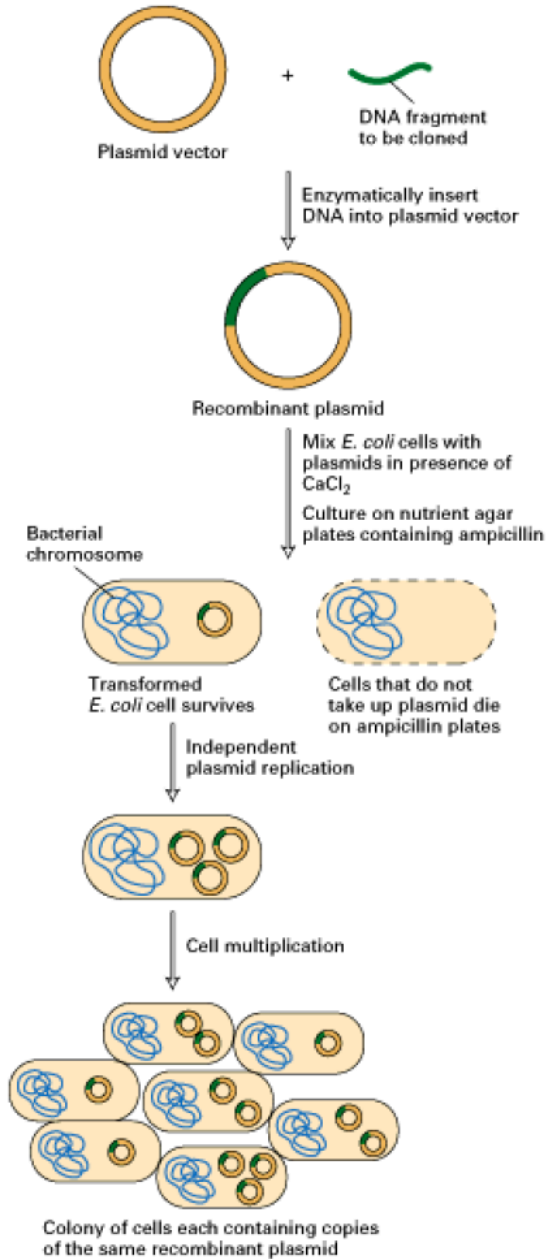
Nouvelle combinaison de l'ADN d'un génome donneur (qui peut être de n'importe quel organisme) avec l'ADN d'un vecteur qui peut être d'origine complètement différente.

Le clonage permet l'insertion d'un fragment d'ADN dans un vecteur permettant ainsi d'en obtenir plusieurs copies

# Obtention de l'ADN recombinant



# Procédure complète



# Obtention de l'ADN de l'organisme donneur

## A partir de l'ADN génomique (chromosomique):

L'ADN génomique est obtenu à partir de lignées cellulaires, de tissus ou d'organismes entiers en fonction de la taille de l'organisme.

Pour un organisme donné on part de n'importe quel lot de cellules, l'ADN génomique sera le même.

## Ordre d'idée de la taille des génomes

Espèce modèle	Taxon	Nb de chromosomes	Taille du génome	Nb de gènes estimé
Virus de la grippe	Virus	ARN simple brin	13 500 bp	12
<a href="#">Bactériophage T4</a>	Virus	1 (circulaire)	165 000 bp	200
<a href="#">Escherichia coli</a>	Bactérie	1 (circulaire)	4,7 Mb	4000
<a href="#">Saccharomyces cerevisiae</a>	Ascomycète	16	14 Mb	6000
<a href="#">Arabidopsis thaliana</a>	Crucifère	5	100 Mb	25000
<a href="#">Caenorhabditis elegans</a>	Nématode	6	100 Mb	13500
<a href="#">Drosophila melanogaster</a>	Insecte	4	165 Mb	12000-16000
<a href="#">Mus musculus</a>	Mammifère	20	3400 Mb	25000-30000
<a href="#">Homo sapiens</a>	Mammifère	23	3400 Mb	25000-30000

### Nombre de gènes

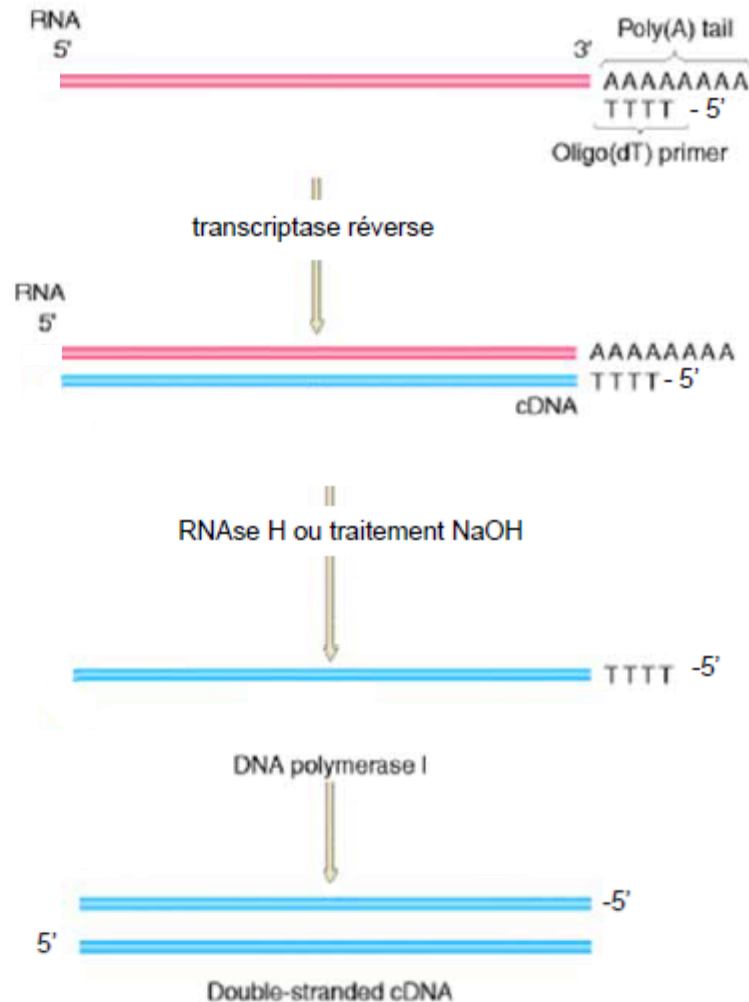
Homme/Souris	3000 Mb	30 000
Nematode	97 Mb	20 000
Drosophile	160 Mb	14 000
<i>S. cerevisiae</i> (levure)	12 Mb	6 200
<i>E. coli</i> (bactérie)	4,7 Mb	4 000

# Obtention de l'ADN de l'organisme donneur

## A partir de l'ARN:

Principe de la "reverse transcription":

- Obtention d'un ADNc





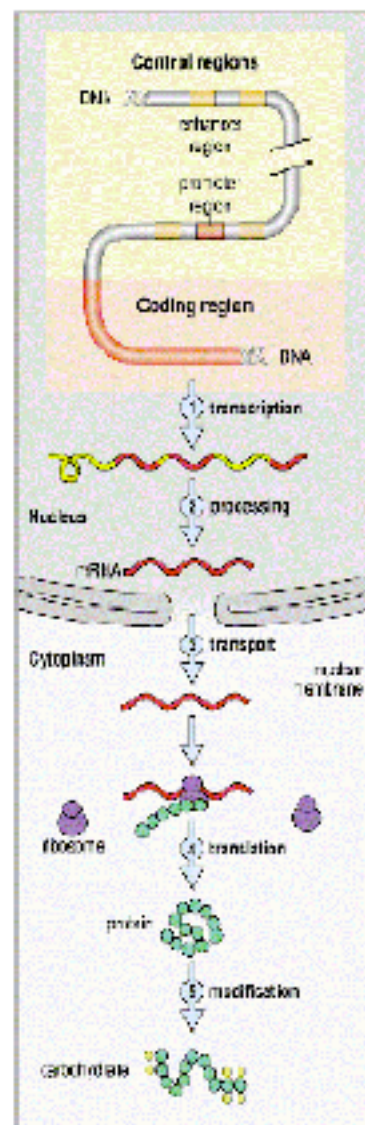
# Informations portées par l'ADN donneur

## Sur l'ADN génomique:

région codante et non codante  
(régions promotrices, régulatrices)

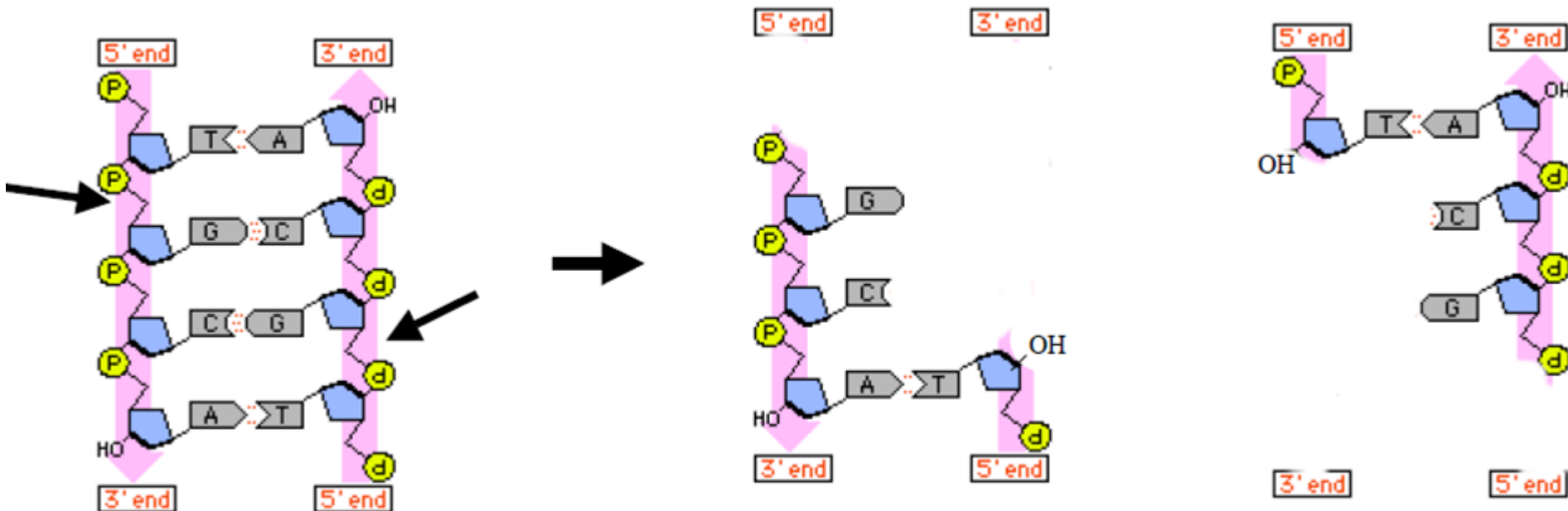
## Sur l'ADN complémentaire:

région codante,  
mais il y a aussi les régions (5' et 3' non traduites)



# Les enzymes de restrictions

**Définition:** sont des enzymes bactériennes qui reconnaissent des séquences spécifiques sur l'ADN de 4 à 8 paires de bases, et qui clivent l'ADN sur les deux brins au niveau de ces sites. Elles coupent l'ADN au niveau des ponts phosphodiester.



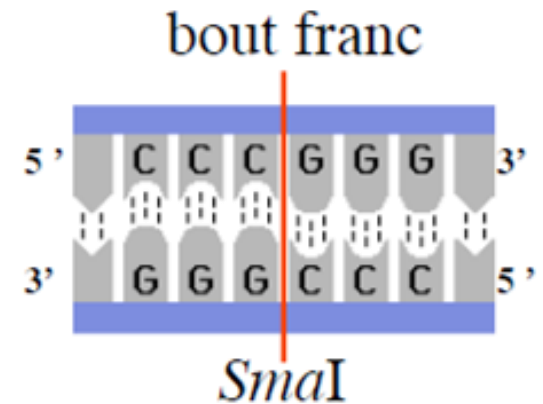
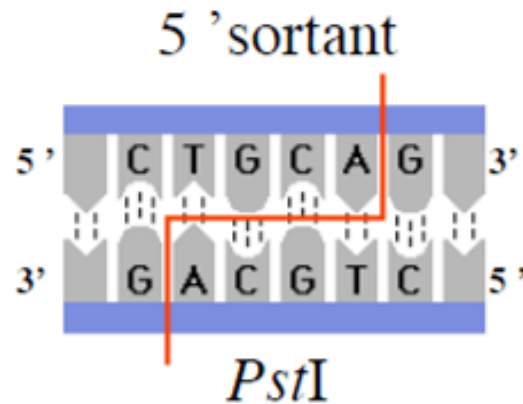
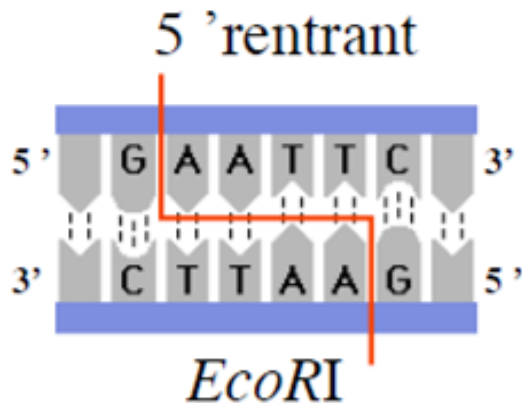
# Les enzymes de restriction

## Caractéristiques:

- la plupart des sites sont des séquences inversées répétées (palindromes)

cas de *EcoRI*: 5' GAATTC 3'  
3' CTTAAG 5'

- Coupure avec formation de bouts collants ou à bouts francs:



Enzyme	Organism from which derived	Target sequence (cut at *) 5' -->3'
<i>Ava</i> I	<i>Anabaena variabilis</i>	C* C/T C G A/G G
<i>Bam</i> HI	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	G* G A T C C
<i>Bgl</i> II	<i>Bacillus globigii</i>	A* G A T C T
<i>Eco</i> RI	<i>Escherichia coli</i> RY 13	G* A A T T C
<i>Eco</i> RII	<i>Escherichia coli</i> R245	* C C A/T G G
<i>Hae</i> III	<i>Haemophilus aegyptius</i>	G G * C C
<i>Hha</i> I	<i>Haemophilus haemolyticus</i>	G C G * C
<i>Hind</i> III	<i>Haemophilus influenzae</i> Rd	A* A G C T T
<i>Hpa</i> I	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	G T T * A A C
<i>Kpn</i> I	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	G G T A C * C
<i>Mbo</i> I	<i>Moraxella bovis</i>	*G A T C
<i>Pst</i> I	<i>Providencia stuartii</i>	C T G C A * G
<i>Sma</i> I	<i>Serratia marcescens</i>	C C C * G G G
<i>Sst</i> I	<i>Streptomyces stanford</i>	G A G C T * C
<i>Sal</i> I	<i>Streptomyces albus</i> G	G * T C G A C
<i>Taq</i> I	<i>Thermophilus aquaticus</i>	T * C G A
<i>Xma</i> I	<i>Xanthamonas malvacearum</i>	C * C C G G G

# Différents vecteurs de clonage

Taille maximum approximative du fragment d'ADN qui peut être cloné dans chaque vecteur

Type de vecteur	ADN cloné en kb
Plasmide	20
Phage lambda	25
Cosmide	45
Phage P1	100
BAC (bacterial artificial chromosome)	300
YAC (yeast artificial chromosome)	1000

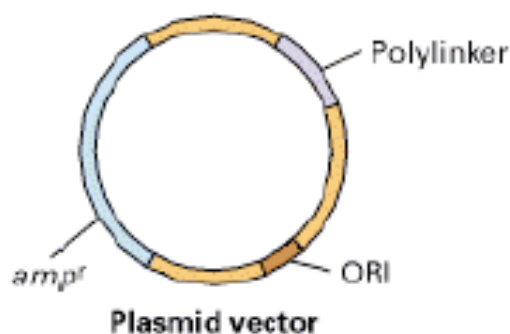
# Les plasmides comme vecteurs de clonage (1)

Molécule d'ADN de taille réduite, d'origine bactérienne

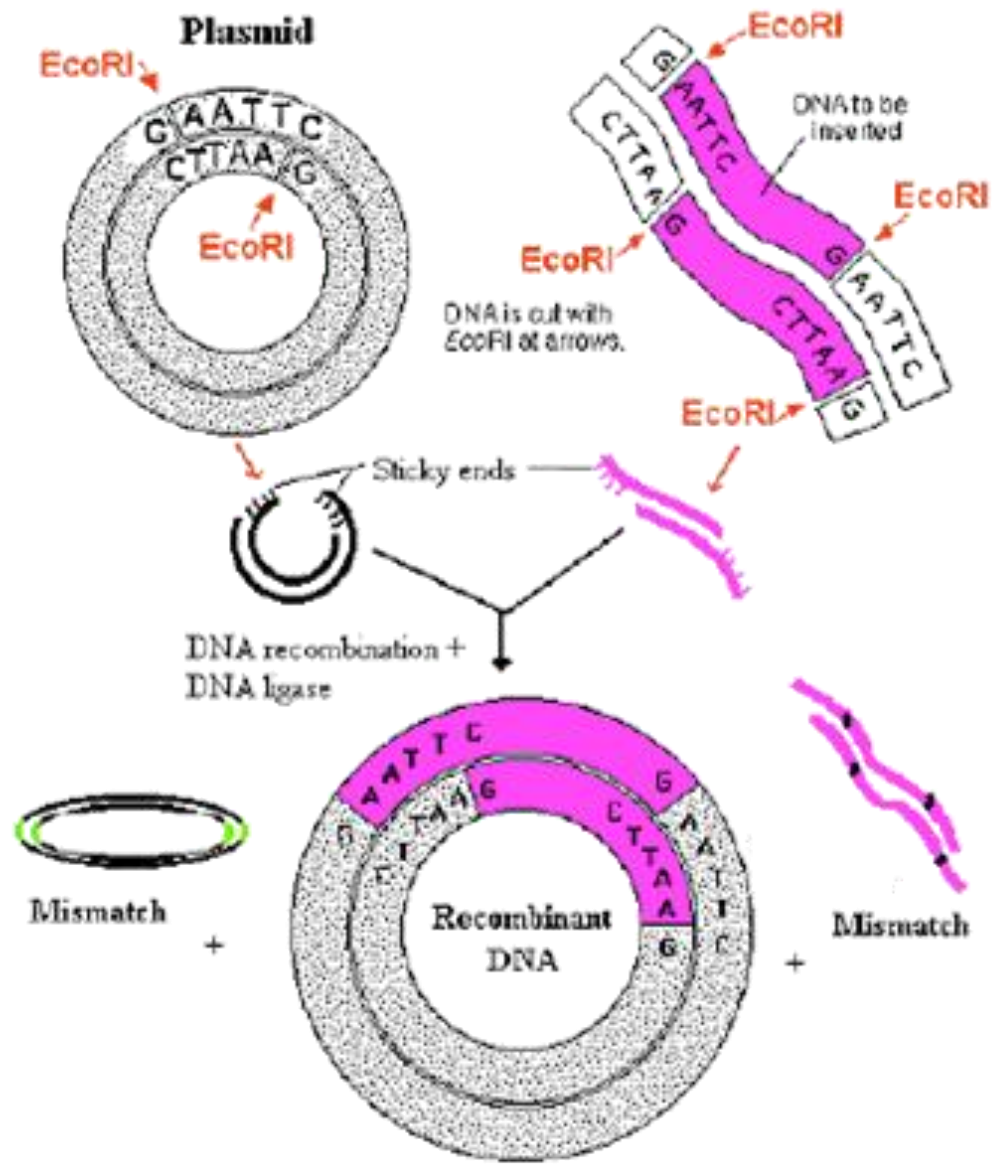
Molécule d'ADN circulaire

Peut être considérée comme un minichromosome capable de répllication autonome

Confère la résistance à un ou plusieurs antibiotiques

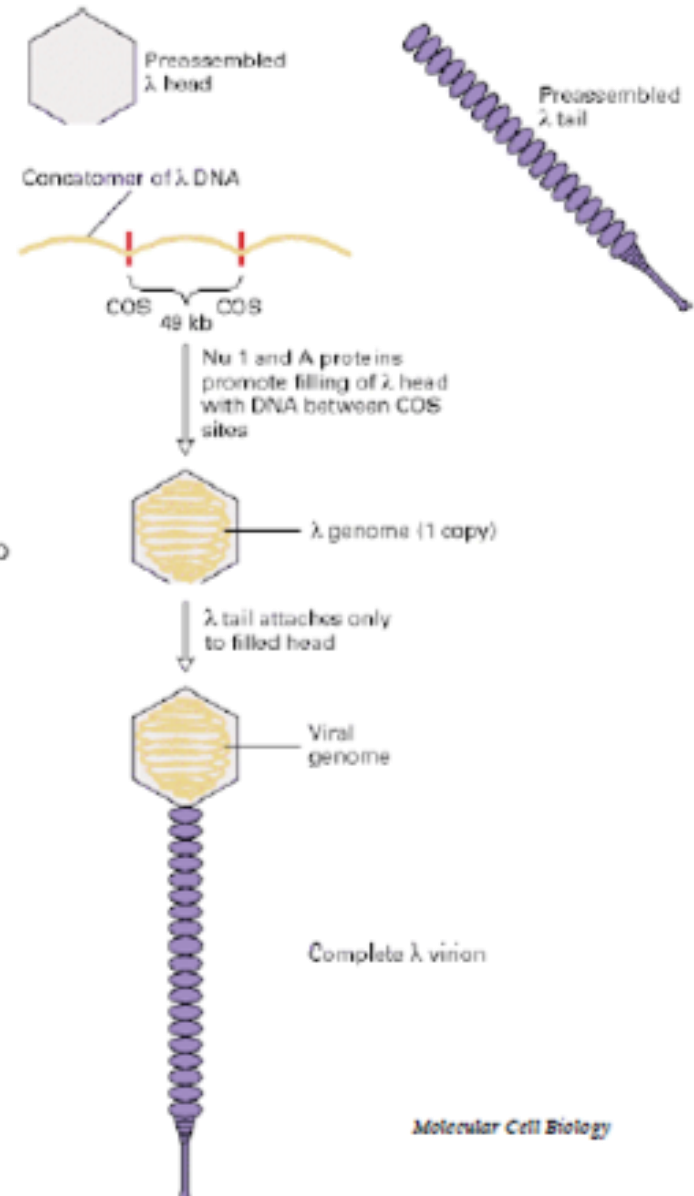
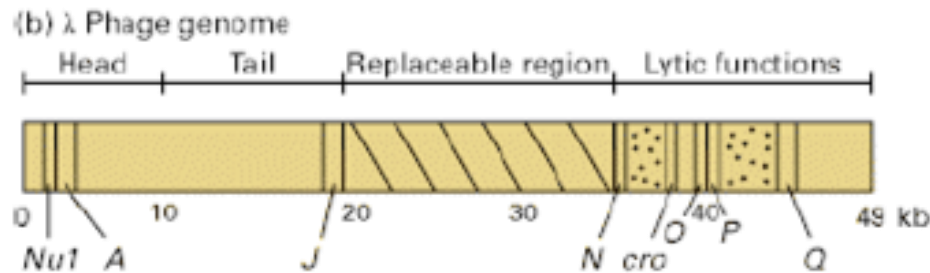


# Les plasmides comme vecteur de clonage (2)



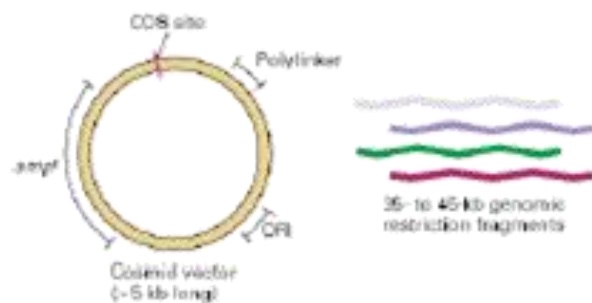
# Les phages comme vecteurs de clonage

☛ Phage = virus de bactéries





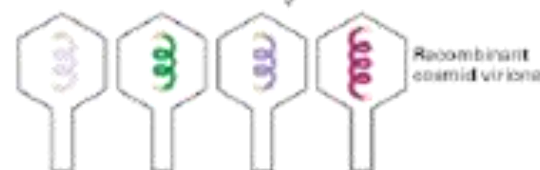
# Les cosmides comme vecteurs de clonage



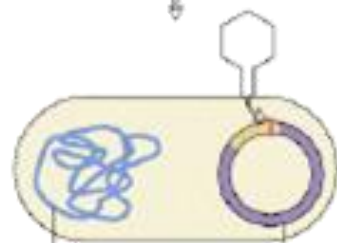
Cut cosmid vector in polylinker with restriction enzyme  
Ligate cut vector to DNA fragments



Subject to  $\lambda$  phage in vitro packaging to insert DNA between adjacent CCS sites into  $\lambda$  heads



Infect *E. coli* cells

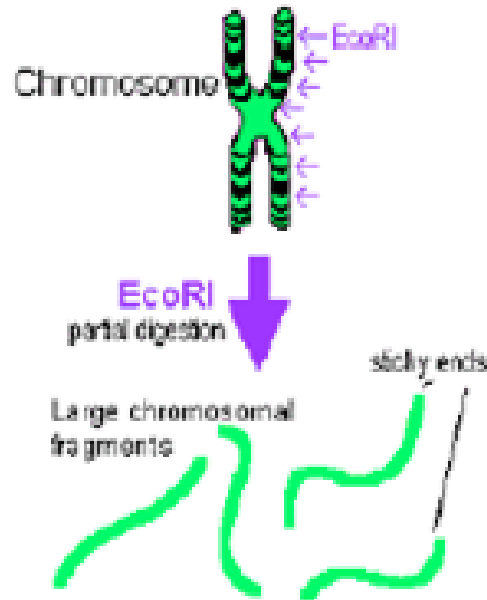


E. coli chromosome  
Cloned genomic fragment in reconstituted plasmid

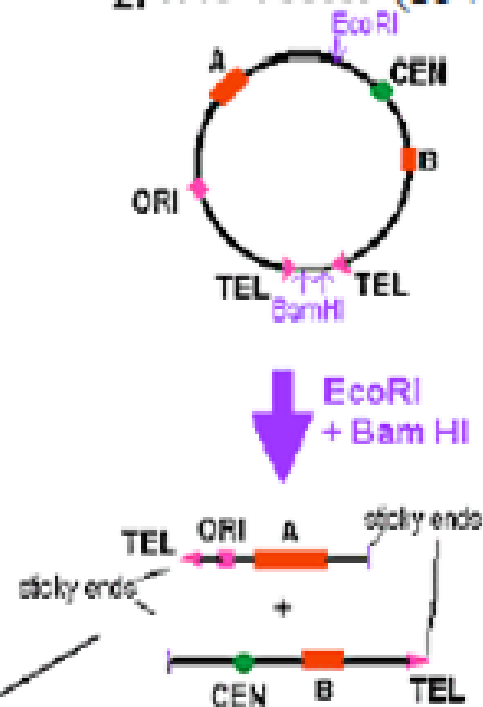
Select for ampicillin-resistant colonies

# Les YACs comme vecteurs de clonage

## 1. Human DNA



## 2. YAC vector (levure)



Recombination  
+ DNA ligase

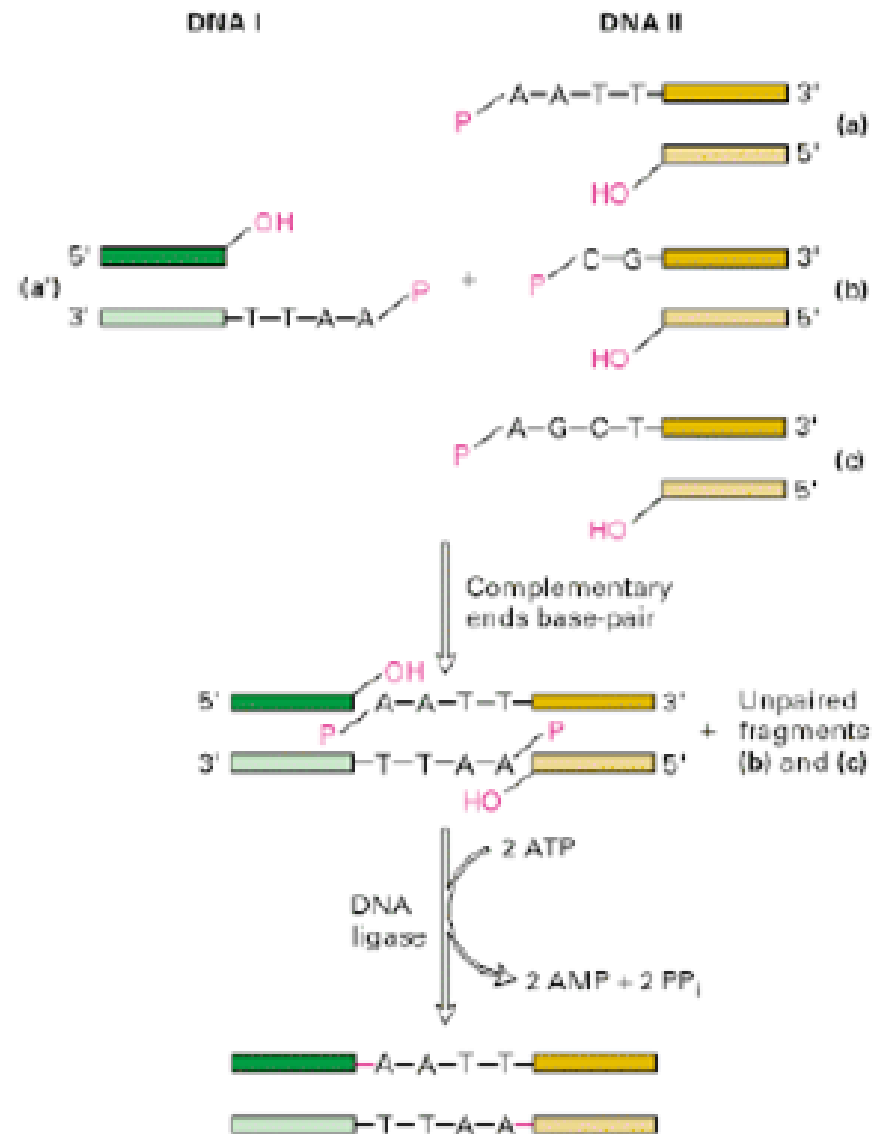
## 3. Yeast artificial chromosome with inserted human DNA



yeast cell  
transformation



# La ligation (ligature...)

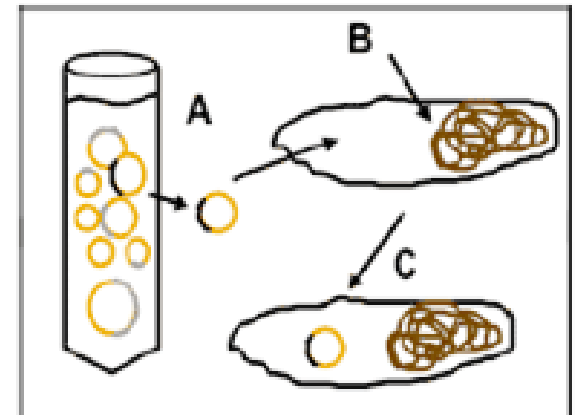
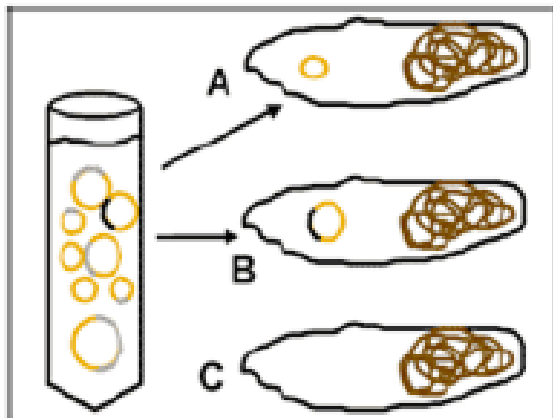
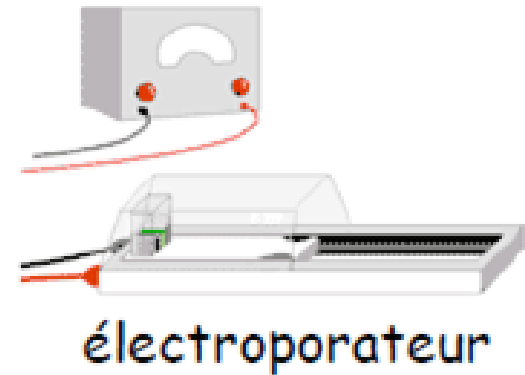


Une enzyme, la ligase, est capable de lier de façon covalente deux molécules d'ADN en une.

# Introduction de l'ADN recombinant dans les cellules hôtes

De type procaryotique  
(bactéries):

**Cas d'un vecteur plasmidique:**  
l'ADN est introduit dans les  
bactéries traitées spécialement le  
plus souvent par choc thermique ou  
par choc électrique.



# Identification des clones intéressants

Dans ce cas les bactéries transformées avec le vecteur ne possédant pas ou possédant l'insert sont sélectionnées --> un criblage est nécessaire

